

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 05 juillet 2001 (05.07.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/02623	Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST99042
Date du dépôt international (jour/mois/année) 22 septembre 2000 (22.09.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 27 septembre 1999 (27.09.99)
Déposant ECKERT, Anne etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

28 mars 2001 (28.03.01)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Eric LESOT (Fax 338.87.40)

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST99042	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 02623	Date du dépôt international (jour/mois/année) 22/09/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 27/09/1999
Déposant AVENTIS PHARMA S.A.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.
2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des **dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☒ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

5

☐ Aucune des figures n'est à publier.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dern. Internationale No
PCT/FR 00/02623

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A01K67/027 C07K14/47 C12N5/10 A61K49/00 G01N33/50		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A01K C07K C12N A61K G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ECKERT A ET AL: "Enhanced vulnerability to cell death in lymphocytes from PS-1 mutant transgenic mice" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 25, no. 1-2, 1999, page 1846 XP000921143 le document en entier	1-3,7
L	DALIE J.E. (PROGRAM MANAGER - SOCIETY FOR NEUROSCIENCE): "Publication dates for the 1999 Abstract Volumes" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, vol. 25, no. 1-2, 16 - 23 août 1999, XP002157614 le document en entier	
-/-		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
* Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">19 janvier 2001</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">01/02/2001</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Lonnoy, O</div>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dénr Internationale No
PCT/FR 00/02623

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CZECH C ET AL: "Characterization of human presenilin 1 transgenic rats: Increased sensitivity to apoptosis in primary neuronal cultures." NEUROSCIENCE, vol. 87, no. 2, novembre 1998 (1998-11), pages 325-336, XP000914789 figure 4; tableau 1	1
X	LAMB B ET AL: "Amyloid production and deposition in mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 yeast artificial chromosome transgenic mice" NAT. NEUROSCI., vol. 2, no. 8, août 1999 (1999-08), pages 695-697, XP002140369 page 695, alinéa 2	1,4,5,7
X	WO 98 51781 A (PLOEG LEONARDUS H T V D ;SISODIA SANGRAM S (US); QIAN SU (US); WON) 19 novembre 1998 (1998-11-19) revendications 13,18	1
A	WO 98 17782 A (DUFF KAREN ;HARDY JOHN (US); UNIV SOUTH FLORIDA (US)) 30 avril 1998 (1998-04-30)	
A	LEUTNER S ET AL: "Altered antioxidant enzyme activity and radical oxygen formation in PS-1 mutant transgenic mice" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTARCTS, vol. 25, no. 1-2, 1999, page 1857 XP000921150 le document en entier	1,2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem: Internationale No

PCT/FR 00/02623

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9851781 A	19-11-1998	EP 0981602 A	01-03-2000
WO 9817782 A	30-04-1998	US 5898094 A	27-04-1999
		AU 719507 B	11-05-2000
		AU 4820297 A	15-05-1998
		EP 0946712 A	06-10-1999



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/02623

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A01K67/027 C07K14/47 C12N5/10 A61K49/00 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A01K C07K C12N A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ECKERT A ET AL: "Enhanced vulnerability to cell death in lymphocytes from PS-1 mutant transgenic mice" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 25, no. 1-2, 1999, page 1846 XP000921143 the whole document	1-3,7
L	DALIE J.E. (PROGRAM MANAGER - SOCIETY FOR NEUROSCIENCE): "Publication dates for the 1999 Abstract Volumes" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, vol. 25, no. 1-2, 16 - 23 August 1999, XP002157614 the whole document -- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 January 2001

Date of mailing of the international search report

01/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lonnoy, O

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/02623

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CZECH C ET AL: "Characterization of human presenilin 1 transgenic rats: Increased sensitivity to apoptosis in primary neuronal cultures." NEUROSCIENCE, vol. 87, no. 2, November 1998 (1998-11), pages 325-336, XP000914789 figure 4; table 1	1
X	LAMB B ET AL: "Amyloid production and deposition in mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 yeast artificial chromosome transgenic mice" NAT. NEUROSCI., vol. 2, no. 8, August 1999 (1999-08), pages 695-697, XP002140369 page 695, paragraph 2	1,4,5,7
X	WO 98 51781 A (PLOEG LEONARDUS H T V D ;SISODIA SANGRAM S (US); QIAN SU (US); WON) 19 November 1998 (1998-11-19) claims 13,18	1
A	WO 98 17782 A (DUFF KAREN ;HARDY JOHN (US); UNIV SOUTH FLORIDA (US)) 30 April 1998 (1998-04-30)	
A	LEUTNER S ET AL: "Altered antioxidant enzyme activity and radical oxygen formation in PS-1 mutant transgenic mice". SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTARCTS, vol. 25, no. 1-2, 1999, page 1857 XP000921150 the whole document	1,2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02623

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9851781 A	19-11-1998	EP 0981602 A	01-03-2000
WO 9817782 A	30-04-1998	US 5898094 A	27-04-1999
		AU 719507 B	11-05-2000
		AU 4820297 A	15-05-1998
		EP 0946712 A	06-10-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS


PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

REC'D 25 JAN 2002

PCT

Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST99042	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/02623	Date du dépôt international (jour/mois/année) 22/09/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 27/09/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A01K67/027		
Déposant AVENTIS PHARMA S.A. et al.		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 8 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input checked="" type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale 		
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 28/03/2001	Date d'achèvement du présent rapport 21.01.2002	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Surdej, P N° de téléphone +49 89 2399 7334	



THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-22 version initiale

Revendications, N°:

1-8 version initiale

Dessins, feuilles:

1/11-11/11 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02623

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

IV. Absence d'unité de l'invention

1. En réponse à l'invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant a

- ☐ limité les revendications.
- ☐ payé des taxes additionnelles.
- ☐ payé des taxes additionnelles sous réserve.
- ☐ ni limité les revendications ni payé des taxes additionnelles.

2. ☒ L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité d'invention et décide, conformément à la règle 68.1, de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles.

3. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que, aux termes des règles 13.1, 13.2 et 13.3,

- ☐ il est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention.
- ☒ il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention, et ce pour les raisons suivantes :
voir feuille séparée

4. En conséquence, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet d'un examen préliminaire international lors de la formulation du présent rapport :

- ☒ toutes les parties de la demande.
- ☐ les parties relatives aux revendications n°s .

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02623

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 6,8
	Non : Revendications 1-5,7
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-8
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-8
	Non : Revendications

**2. Citations et explications
voir feuille séparée**

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: ECKERT A ET AL: 'Enhanced vulnerability to cell death in lymphocytes from PS-1 mutant transgenic mice' SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 25, no. 1-2, 1999, page 1846
- D2: DALIE J.E. (PROGRAM MANAGER - SOCIETY FOR NEUROSCIENCE): 'Publication dates for the 1999 Abstract Volumes' SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, vol. 25, no. 1-2, 16 - 23 août 1999
- D3: CZECH C ET AL: 'Characterization of human presenilin 1 transgenic rats: Increased sensitivity to apoptosis in primary neuronal cultures.' NEUROSCIENCE, vol. 87, no. 2, novembre 1998 (1998-11), pages 325-336
- D4: LAMB B ET AL: 'Amyloid production and deposition in mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 yeast artificial chromosome transgenic mice' NAT. NEUROSCI., vol. 2, no. 8, août 1999 (1999-08), pages 695-697
- D5: WO 98 51781 A (PLOEG LEONARDUS H T V D ;SISODIA SANGRAM S (US); QIAN SU (US); WON) 19 novembre 1998 (1998-11-19)
- D6: WO 98 17782 A (DUFF KAREN ;HARDY JOHN (US); UNIV SOUTH FLORIDA (US)) 30 avril 1998 (1998-04-30)
- D7: LEUTNER S ET AL: 'Altered antioxidant enzyme activity and radical oxygen formation in PS-1 mutant transgenic mice' SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 25, no. 1-2, 1999, page 1857

Introduction

La demande divulgue un animal transgénique exprimant une forme multi-mutée de la préséniline 1 et permettant de détecter un phénomène apoptotique dans un tissu périphérique renouvelable, l'utilisation dudit animal, cellule extraite dudit animal et utilisation de ladite cellule.

Concernant le point IV

Absence d'unité de l'invention

1. Les seules caractéristiques techniques communes qui peuvent être distinguées entre les différents animaux transgéniques revendiqués est qu'ils **expriment une forme multi-mutée de la préséniline 1 et qu'ils permettent de détecter un**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

phénomène apoptotique dans un tissu périphérique renouvelable. En considérant le fait que de tels éléments techniques sont connus de l'état antérieur de la technique au vue des documents D1, D4 et D7 (voir point 3), il n'existe pas d'élément technique particulier au sens de la règle 13.2 PCT liant les différentes inventions revendiquées. Chaque animal transgénique portant une combinaison spécifique de mutations de la préséniline correspond donc à une invention séparée.

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Nouveauté et activité inventive (Art. 33 (1)-(3) PCT)

2. Plusieurs critères utilisés pour définir l'invention ne sont pas clairs et vont à l'encontre de l'Article 6 PCT, ce qui conduit à des objections quant à la nouveauté et de l'inventivité de l'objet revendiqué (voir en particulier le point 6):
3. Les **revendications 1-5 and 7** ne sont pas nouvelles en considérant D1, D4 et D7. D1, D4 et D7 divulguent des animaux transgéniques portant plusieurs mutations dans le gène de la préséniline humaine (e.g. D4: page 695, colonne de droite, 2e paragraphe). Le document D4 divulgue, en particulier, des souris transgéniques portant la combinaison de mutations M146L et H163R du gène humain de la préséniline (e.g. page 695, colonne de droite, 2e paragraphe). Il est à noter que le document D1 divulgue que des lymphocytes de souris transgéniques exprimant des gènes portant des mutations multiples du gène de la préséniline ont une susceptibilité accrue à l'apoptose par rapport à des cellules de type sauvage.
4. Les **revendications 6 et 8** sont nouvelles mais pas inventives en considérant, par exemple, l'un des documents D1, D4 ou D7 en combinaison avec soit D5, soit D6 (e.g. D5: page 6, 2e paragraphe, page 11, 1e paragraphe, page 12, 1e paragraphe, D6: page 15, 2e paragraphe). Les documents D5 et D6 fournissent des exemples d'animaux transgéniques portant des mutations dans le gène de la

THIS PAGE BLANK (USPTO)

préséniline dont l'utilisation dans la mise en évidence de composés destinés au traitement des maladies neurodégénérative, en particulier, de la maladie de Alzheimer, est divulguée.

5. Il est à noter que si la nouveauté des revendications 1-5 avait été reconnue, l'inventivité desdites revendications aurait été mise en question sur la base des documents D1, D4 ou D7 en combinaison avec l'un des documents D3, D5 ou D6.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

6. Dans les **revendications 1-3**, les phrases "permettant de détecter un phénomène apoptotique dans un tissu périphérique renouvelable", "il permet de détecter un phénomène apoptotique dans ses lymphocytes" ou "il permet de détecter un phénomène apoptotique dans ses lymphocytes T" ne sont pas claires dans la mesure où n'importe quel animal transgénique exprimant une forme multi-mutée de la préséniline 1 est compris dans la revendication 1 puisque quasiment toute cellule peut présenter un phénomène apoptotique, en particulier, beaucoup de types cellulaires périphériques renouvelables peuvent présenter un phénomène apoptotique au cours de la vie d'un animal, par exemple les lymphocytes sont soumis à de nombreuses régulations comprenant des phénomènes apoptotiques. Lesdites revendications manquent donc de clarté (Art. 6 PCT).
7. L'expression "combinées entre elles" dans la **revendication 5** n'est pas claire et peut être interprétée comme voulant dire "n'importe quelle combinaison" de 2 mutations ou plus auxquelles il est fait référence dans la revendication 5 (Art. 6 PCT).
8. Il est à noter que si la nouveauté et l'activité inventive, d'animaux transgéniques ayant une combinaison précise de mutations multiples dans le gène de la préséniline, avaient été reconnues, ce qui n'est pas le cas ici, un seul exemple de mutant à des positions multiples est divulgué dans la présente application. L'objet revendiqué n'est donc pas supporté sur toute son étendue dans la mesure où toutes les combinaisons multiples de mutations de la préséniline ne vont pas conduire à l'effet désiré. L'objet revendiqué n'est donc pas suffisamment fondé sur

THIS PAGE BLANK (USPTO)

la description (Article 6 PCT) et divulgué comme l'exige l'Article 5 PCT.

9. Les références à des positions particulières d'une séquence protéique, dans les revendications 4 et 5, n'ont pas de sens dans la mesure où la séquence spécifique de laquelle sont dérivées ces positions n'est pas précisée. Lesdites revendications ne sont donc pas claires (Art. 6 PCT).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

10/088.139

6

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference ST99042	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/02623	International filing date (day/month/year) 22 September 2000 (22.09.00)	Priority date (day/month/year) 27 September 1999 (27.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01K 67/		
Applicant AVENTIS PHARMA S.A.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 28 March 2001 (28.03.01)	Date of completion of this report 21 January 2002 (21.01.2002)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02623

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages 1-22, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the claims, Nos. 1-8, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig 1/11-11/11, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

Reference is made to the following documents:

- D1: ECKERT A ET AL: 'Enhanced vulnerability to cell death in lymphocytes from PS-1 mutant transgenic mice' SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 25, no. 1-2, 1999, page 1846
- D2: DALIE J.E. (PROGRAM MANAGER - SOCIETY FOR NEUROSCIENCE): 'Publication dates for the 1999 Abstract Volumes' SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, vol. 25, no. 1-2, 16-23 August 1999
- D3: CZECH C ET AL: 'Characterization of human presenilin 1 transgenic rats: Increased sensitivity to apoptosis in primary neuronal cultures.' NEUROSCIENCE, vol. 87, no. 2, November 1998 (1998-11), pages 325-336
- D4: LAMB B ET AL: 'Amyloid production and deposition in mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 yeast artificial chromosome transgenic mice' NAT. NEUROSCI., vol. 2, no. 8, August 1999 (1999-08), pages 695-697
- D5: WO 98 51781 A (PLOEG LEONARDUS H T V D; SISODIA SANGRAM S (US); QIAN SU (US); WON) 19 November 1998 (1998-11-19)
- D6: WO 98 17782 A (DUFF KAREN; HARDY JOHN (US); UNIV SOUTH FLORIDA (US)) 30 April 1998 (1998-04-30)
- D7: LEUTNER S ET AL: 'Altered antioxidant enzyme activity and radical oxygen formation in PS-1 mutant transgenic mice' SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 25, no. 1-2, 1999, page 1857

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

Introduction

The application discloses a transgenic animal expressing a multiple mutated form of presenilin 1 and enabling an apoptotic phenomenon to be detected in a renewable peripheral tissue, the use of said animal, a cell extracted from said animal and use of said cell.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV

- 1 The only common technical features which can be discerned among the various transgenic animals claimed is that they **express a multiple mutated form of presenilin 1 and that they enable to detect an apoptotic phenomenon in a renewable peripheral tissue.** As such technical features are known from the prior art, see documents D1, D4 and D7 (see Box V, point 2), there is no specific technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 linking the various inventions claimed. Each transgenic animal carrying a specific combination of mutations of presenilin therefore corresponds to a separate invention.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/02623

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	6, 8	YES
	Claims	1-5, 7	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-8	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Several criteria used to define the invention are not clear and are contrary to PCT Article 6, which leads to objections concerning the novelty and inventive step of the subject matter claimed (see in particular Box VIII, point 1).

2. **Claims 1-5 and 7** are not novel in view of D1, D4 and D7. D1, D4 and D7 disclose transgenic animals carrying several mutations in the gene for human presenilin (e.g. D4: page 695, right column, 2nd paragraph). Document D4 discloses, in particular, transgenic mice carrying the combination of mutations M146L and H163R of the gene for human presenilin (e.g. page 695, right column, 2nd paragraph). It should be noted that document D1 discloses that the lymphocytes of transgenic mice expressing genes carrying multiple mutations of the gene for presenilin have increased sensitivity to apoptosis over wild-type cells.

3. **Claims 6 and 8** are novel but not inventive, in view, for example, of one of documents D1, D4 or D7 in combination with either D5, or D6 (e.g. D5: page 6, 2nd paragraph, page 11, 1st paragraph, page 12, 1st

THIS PAGE BLANK (USPTO)

paragraph, D6: page 15, 2nd paragraph). Documents D5 and D6 provide examples of transgenic animals carrying mutations in the gene for presenilin, the use of which in establishing compounds for treating neuro-degenerative diseases, in particular Alzheimer's disease, is disclosed.

4. It should be noted that if the novelty of Claims 1-5 had been recognised, the inventive step of said claims would have been questioned on the basis of documents D1, D4 or D7 in combination with one of documents D3, D5 or D6.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. In **Claims 1-3**, the sentences "enabling to detect an apoptotic phenomenon in a renewable peripheral tissue", "it enables to detect an apoptotic phenomenon in its lymphocytes" or "it enables to detect an apoptotic phenomenon in its lymphocytes T" are not clear, in so far as any transgenic animal expressing a multiple mutated form of presenilin 1 is included in Claim 1, since virtually every cell can present an apoptotic phenomenon. In particular, many renewable peripheral cellular types can present an apoptotic phenomenon in the course of an animal's life, for example lymphocytes are subject to many adjustments including apoptotic phenomena. The said claims therefore lack clarity (PCT Article 6).
2. The expression "combined among themselves " in **Claim 5** is not clear and can be interpreted as meaning "any combination" of 2 or more mutations to which reference is made in Claim 5 (PCT Article 6).
3. It should be noted that if the novelty and inventive step of transgenic animals having a specific combination of multiple mutations in the gene for presenilin had been recognised, which is not the case here, a single example of a mutant at multiple positions is disclosed in the present application. The subject matter claimed is not, therefore, supported throughout its extent, in so far as not all the multiple combinations of mutations of presenilin will lead to the desired effect. The subject matter claimed is not, therefore,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/02623

VIII. Certain observations on the international application

sufficiently supported by the description (PCT Article 6) nor disclosed in accordance with the requirements of PCT Article 5.

4. The references to particular positions of a proteic sequence in Claims 4 and 5 have no meaning, in so far as the particular sequence from which these positions are derived is not specified. Therefore, said claims are not clear (PCT Article 6).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization

International Bureau

WIPO

(43) International publication date

5 April 2001 (05.04.2001)

PCT

(10) International publication number

WO 01/22811 A1

(51) International patent classification⁷:

A01K 67/027, C07K 14/47,
C12N 5/10, A61K 49/00, G01N 33/50

(71) Applicant (for all designated States except US):

AVENTIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20, avenue
Raymond Aron, F-92160 Antony (FR).

(21) International application number: PCT/FR00/02623

(22) International filing date: 22 September 2000 (22.09.2000)

(25) Language of filing:

(26) Language of publication: French

(30) Data relating to the priority:

99/12,017	27 September 1999 (27.09.1999)	FR
60/181,306	9 February 2000 (09.02.2000)	US

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (US only): ECKERT, Anne
[DE/DE]; Rheindammstrasse 21, 68163 Mannheim
(DE). MULLER, Walter [DE/DE]; Hvhnenstrasse 49A,
67550 Worms-Herrnsheim (DE). CZECH, Christian
[FR/FR]; 4, cité de l'Alma, F-75007 Paris (FR).
PRADIER, Laurent [FR/FR]; 23, avenue Cambacérès,
F-91370 Verrières (FR). TREMP, Gunter [DE/FR]; 6,
résidence du Parc d'Ardenay, F-91120 Palaiseau (FR).

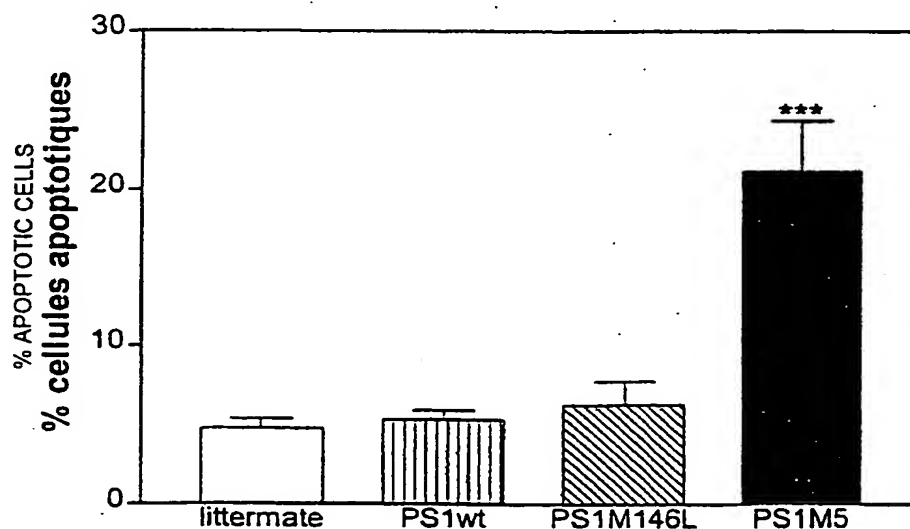
(74) Representative: BOUVET, Philippe; Aventis Pharma
S.A., Direction Brevets, 20, Avenue Raymond Aron,
F-92165 Antony Cedex (FR).

[continued on next page]

As printed

(54) Title: TRANSGENIC ANIMAL EXPRESSING A MULTIPLE MUTATED FORM OF PRESENILIN 1

(54) Titre: ANIMAL TRANSGENIQUE EXPRIMANT UNE FORME MULTI-MUTÉE DE LA PRESENILINE 1



(57) Abstract: The invention concerns the field of transgenic animal models and more particularly, animal models of Alzheimer disease. The invention relates to a transgenic animal expressing a multiple mutated form of presenilin 1 and enabling to detect an apoptotic phenomenon in a renewable peripheral tissue.

(57) Abrégé: La présente invention concerne le domaine des modèles animaux transgéniques et plus particulièrement, les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer. L'invention se rapporte à un animal transgénique exprimant une forme multi-mutée de la préséniline 1 et permettant de détecter un phénomène apoptotique dans un tissu périphérique renouvelable.

[continued on next page]

WO 01/22811 A1

(81) **Designated states (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Designated states (regional):** ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- With the International Search Report.
- Before expiry of the period provided for amending the claims, will be republished if such amendments are received.

For an explanation of the two-letter codes and the other abbreviations, reference is made to the explanations ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular edition of the PCT Gazette.

ANIMAL TRANSGENIQUE EXPRIMANT UNE FORME MULTI-MUTÉE DE LA PRESENILINE 1

5

La présente invention concerne le domaine des modèles animaux transgéniques et plus particulièrement, les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer. L'invention se rapporte à un animal transgénique exprimant une forme multi-mutée de la préséniline 1 et permettant de détecter un phénomène apoptotique dans un tissu périphérique renouvelable.

10

La maladie d'Alzheimer (AD) est une maladie neurodégénérative progressive qui affecte une large proportion de la population âgée. Cette maladie est caractérisée sur le plan clinique par une perte de la mémoire et un déclin des fonctions cognitives, sur le plan neuropathologique par la présence dans le cerveau de dépôts neurofibrillaires intracellulaires et de dépôts extracellulaires du peptide β -amyloïde ($A\beta$) formant les plaques amyloïdes (Yanker et al., 1996) ainsi qu'une perte neuronale prononcée. A ces signes s'ajoutent un nombre important d'autres changements anormaux incluant une altération des mécanismes de protection contre les radicaux libres..

15

Les plaques amyloïdes sont majoritairement composées des peptides $A\beta$ à 40 ou 42 résidus qui sont générés lors du processus protéolytique de la protéine précurseur du peptide β -amyloïde (APP). Les dépôts extracellulaires de $A\beta$ sont très spécifiques de l'AD et des désordres associés. Ils représentent la caractéristique précoce et invariable de toutes les formes de l'AD, incluant les formes familiales (FAD). Les FAD apparaissent de manière relativement précoce (entre 40 et 60 ans) et sont dues à des mutations dans le gène de l'APP dans 5 % des cas de FAD avec six mutations faux-sens simples ou doubles identifiées; dans le gène de la préséniline 1 (PS 1) dans 50 à 70 % des cas de FAD avec plus de 40 mutations différentes identifiées jusqu'à présent; et dans le gène de la préséniline 2 (PS 2) dans des cas plus rares de FAD avec 2 mutations faux-sens décrites (pour revue voir Price et Sisodia, 1998). Des mutations dans ces trois gènes ont été démontrées comme induisant des changements dans la

25

30

protéolyse de l'APP, qui conduisent à une surproduction de A β , spécialement de la forme longue A β 42, et à l'apparition précoce de la pathologie et des symptômes similaires à ceux des formes sporadiques de l'AD.

5 Dans les modèles animaux transgéniques décrits jusqu'à présent la symptomatologie de perte neuronale comparable à l'AD est exprimée uniquement au niveau des neurones ou dans leur entourage direct et en particulier le phénomène d'apoptose (Chiu et al., 1999). Cependant, ces modèles présentent plusieurs inconvénients dont notamment la nécessité d'élever un très grand nombre d'animaux le plus souvent sur des périodes de temps longues, pouvant aller jusqu'à 24 mois, afin de suivre la mise
10 en place des symptômes de l'AD, le sacrifice systématique des animaux pour l'étude de la pathologie et ainsi des protocoles expérimentaux particulièrement fastidieux et coûteux.

Il n'existe donc pas de modèle animal de l'AD permettant de mesurer les symptômes, et en particulier, les phénomènes de mort cellulaire associés à l'AD dans des tissus
15 périphériques.

La présente invention résulte donc de la recherche d'un nouveau modèle animal représentatif de la neuropathologie permettant de mesurer les symptômes associés à l'AD et en particulier l'apoptose, dans des tissus périphériques.

Un premier objet de l'invention concerne donc un modèle animal transgénique de la
20 maladie d'Alzheimer exprimant la préséniline 1 multi mutée.

On entend par animal transgénique tout animal non-humain présentant une modification de son génome. La modification du génome peut résulter d'une altération ou une modification de un ou plusieurs gènes par "knock-in" ou par "knock-out". Cette modification peut être due à l'action d'agents altérants ou mutagènes classiques
25 ou bien effectuée par mutagenèse dirigée, comme cela est décrit dans Matériels et Méthodes.

La modification du génome peut également résulter d'une insertion de gène(s) ou de remplacement de gène(s) dans sa (leur) forme sauvage ou mutée.

Les modifications du génome sont avantageusement effectuées sur des cellules souches reproductrices et préférentiellement sur les pronucléi.

- 5 Dans le cadre de la présente invention, le modèle animal est avantageusement un mammifère. En particulier il peut s'agir d'une souris, d'un rat ou d'un lapin obtenu selon les techniques classiques de transgénèse. A titre d'exemple illustrant l'un des procédés de transgénèse, on peut citer la méthode de microinjection d'une cassette d'expression comprenant les gènes modifiés dans les deux pronucléi fécondés, tel que
10 cela est décrit dans Matériels et Méthodes.

A cet égard, le modèle animal de l'invention est obtenu par injection d'une cassette d'expression comprenant un acide nucléique. De manière préférentielle, cet acide nucléique est un ADN qui peut être un ADN génomique (ADNg) ou un ADN complémentaire (ADNc).

- 15 Dans le cadre du modèle de l'invention, l'ADN code pour tout gène de la PS1 de sorte que les cellules du modèle animal expriment la protéine multi-mutée.

La séquence de la protéine PS1 humaine non-mutée a été décrite par Sherrington et al en 1995. On entend par protéine multi-mutée, la protéine PS1 comprenant au moins trois mutations combinées ou associées entre elles, c'est-à-dire présentent en même
20 temps dans la dite protéine. Selon une mode préféré de l'invention, l'ADN code pour le gène de la PS1 qui comporte 5 mutations (PS1M5).

Les mutations dans le gène de PS1 peuvent être l'une des 40 mutations décrites jusqu'à présent dans la littérature. De manière préférentielle, les mutations dans le gène de PS1 sont M146L, H163R, A246E, L286V, C410Y, I143T, L235P, P264L,
25 P267S, E317G, G384A, L392V, A426P et/ou P436S. Elles sont en combinaison partielle les unes aux autres.

Pour la réalisation d'un modèle selon l'invention, les mutations M146L, H163R, A246E, L286V, C410Y, combinées entre elles, sont préférées.

5 Dans le cadre du modèle de l'invention, l'ADN est placé sous le contrôle de séquences permettant son expression et en particulier de séquences promotrices de la transcription.

A titre de séquences promotrices, on peut citer tout particulièrement le promoteur HMG (Gautier et al., 1989), ainsi que le promoteur PDGF (Sasahara et al., 1991), le promoteur Thy-1 (Lüthi et al., 1997) et le promoteur du gène du Prion (Scott et al., 1992).

10 Selon une mise en œuvre particulièrement intéressante de l'invention, le modèle animal comprend le gène de la PS1 ayant les mutations M146L, H163R, A246E, L286V, C410Y placé sous le contrôle du promoteur HMG.

Le modèle animal selon l'invention est très avantageux car il correspond à un modèle pratique et représentatif des phénomènes de mort cellulaire de l'AD. En effet, ce
15 modèle présente des symptômes associés à l'AD dont notamment l'apoptose des cellules et le stress oxydatif et permet en plus de mesurer ces symptômes dans les cellules des tissus périphériques renouvelables. Il est à noter que le stress oxydatif se manifeste également dans le cerveau de ces animaux. On doit entendre par tissus périphériques renouvelables, tout tissus présentant un renouvellement de ces cellules
20 au cours du temps. A titre d'exemple de tissus périphérique renouvelable on peut citer la rate, le foie, le sang..... De manière préférée, le phénomène apoptotique est mesuré dans les cellules du sang et encore plus préférentiellement dans les lymphocytes. Parmi les lymphocytes, les lymphocytes T sont préférés pour l'invention.

Ainsi, les résultats décrits dans les exemples démontrent que la souris transgénique
25 exprimant la PS1 multi-mutée, développe des altérations cellulaires retrouvées dans la maladie d'Alzheimer et, en particulier, présente une sensibilité accrue à l'apoptose. Ce phénotype n'est d'ailleurs pas observé avec un mutant pathologique naturel simple du

genre M146L. Ce phénotype est obtenu spécifiquement avec une forme non naturelle regroupant plusieurs mutations, et de préférence 5 mutations, individuelles sur le même ADNc. En outre, par l'expression ectopique du transgène grâce au promoteur ubiquitaire, ce modèle permet de détecter un phénomène apoptotique (lié à des mutations de la maladie d'Alzheimer) dans un tissu périphérique renouvelable. Ce modèle fournit donc une source beaucoup plus pratique de matériel (n'exigeant pas le sacrifice de l'animal) permettant donc un suivi longitudinal.

De plus, les altérations du métabolisme du Calcium et des radicaux libres observées dans ce modèle de manière très nette sont similaires à l'augmentation de la latence de la réponse calcique et du stress oxydatif observées chez les patients Alzheimer (Eckert et al., 1997 and 1998) ce qui renforce la pertinence de ce modèle.

La présente invention est donc également relative à l'utilisation du modèle animal, tel que décrit précédemment, pour la mise en évidence de composés destinés au traitement des maladies neurodégénératives, de préférence la maladie d'Alzheimer.

En effet, par ses propriétés avantageuses ce modèle permet, en comparaison des modèles connus, la mise en évidence de composés particulièrement adaptés au traitement de l'AD, notamment, telle que décrite chez l'homme.

Ces composés peuvent être des molécules chimiques, des molécules peptidiques ou protéiques, des anticorps, des molécules chimériques ainsi que des ADNs antisens ou des ribozymes.

Les composés mis en évidence peuvent être utilisés comme médicament, tels quels ou en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable afin d'obtenir une composition pharmaceutique. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc., ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Les injections pouvant être réalisée par voie stéréotaxique, topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc.

5 La mise en évidence des composés décrits précédemment repose sur la mise en contact, notamment par une administration telle que par exemple une injection, du modèle animal de l'invention avec un composé ou un mélange de composés supposé(s) avoir une action et de mesurer ensuite le ou les effet(s) des composés notamment au niveau des tissus périphériques du modèle sur les différents changements biochimiques et/ou histologiques comme par exemple ceux décrits dans
10 les parties Méthodes et Résultats dont l'apoptose, le taux de calcium intracellulaire, le taux de radicaux libres....

Un autre objet de l'invention concerne une cellule extraite du modèle animal tel que décrit précédemment ainsi que son utilisation pour la mise en évidence de composés destinés au traitement des maladies neurodégénératives, de préférence la maladie
15 d'Alzheimer.

La mise en évidence de composés décrits précédemment repose sur la mise en contact de cellules extraites du modèle animal de l'invention avec un composé ou un mélange de composés supposé(s) avoir une action et de mesurer ensuite le ou les effet(s) des composés au niveau des cellules entières, dans des homogénats de cellules ou sur une
20 fraction subcellulaire, sur différents paramètres tels que la mort cellulaire, la production du peptide A β , production de radicaux libres, etc...

Les résultats décrits dans les exemples démontrent les avantages du modèle de l'invention et supportent clairement l'utilisation de ce modèle transgénique comme outil de mesure et de suivi simple et rapide dans le cadre de stratégies thérapeutiques
25 telles que notamment la mise au point d'agents anti-apoptotiques ou d'agents limitant la mort cellulaire liée à l'AD de façon plus générale.

La présente invention sera décrite plus en détail à l'aide des exemples qui suivent mais qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

5 LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Analyse de l'expression de PS1 humaine chez les souris transgéniques PS1M5 (pistes 1,5,9), PS1M146L (pistes 2,6,10), PS1wt (pistes 3,7,11) et non transgéniques (pistes 4,8,12). Les tissus des souris transgéniques : lymphocytes (pistes 1-4), rate (pistes 5-8) et cerveau (pistes 9-12), ont été lysés et analysés par immunoblot en utilisant un anticorps spécifique pour la séquence humaine de PS1 (épitope dans la région N-term de PS1). L'holoprotéine PS1(approx. 50kDa) ainsi que le fragment N-terminal sont observables. L'expression du transgène est observable pour les trois transgéniques. Il y a absence de clivage endoprotéolytique pour la protéine PS1M5.

Figure 2 : Apoptose accrue des lymphocytes issus de souris transgéniques PS1M146L et PS1M5 en conditions basales. Les taux d'apoptose en condition basale ont été mesurés dans des lymphocytes dissociés. Les lymphocytes PS1M5 montrent un taux d'apoptose plus élevé par rapport à PS1wt (*, $p < 0.05$) ou aux témoins littermates, non transgéniques (**, $p < 0.05$)). Il en est de même pour les lymphocytes PS1M146L par rapport aux contrôles littermates (+, $p < 0.05$)

Figure 3 : Apoptose après 2.5h d'incubation de lymphocytes issus de souris transgéniques. Après 2.5h d'incubation, les lymphocytes PS1M5 montrent un taux d'apoptose significativement plus élevé (***, $p < 0.001$) par rapport à PS1wt, PS1M146L ou aux contrôles non transgéniques (littermates)

Figure 4 : Apoptose induite par traitement au déoxy-ribose de lymphocytes issus de souris transgéniques. Après induction au deoxy-D-ribose (10mM), les taux

d'apoptose sont significativement plus élevés dans le groupe PS1M5 que dans les autres groupes (**, $p < 0.01$ vs PS1wt et PS1M146L ; ***, $p < 0.001$ vs littermates).

Figure 5 : Apoptose induite par traitement au peroxyde d'hydrogène de lymphocytes issus de souris transgéniques. Après induction au peroxyde d'hydrogène (1mM), les
5 taux d'apoptose sont significativement plus élevés dans le groupe PS1M5 que dans les autres groupes (***, $p < 0.001$). Il n'y a aucune différence entre les autres groupes..

Figure 6 : Apoptose induite par traitement à la dexaméthasone de lymphocytes issus de souris transgéniques. Après induction à la dexaméthasone (10^{-7} M), les taux d'apoptose sont significativement plus élevés dans le groupe PS1M5 que dans les
10 autres groupes (*, $p < 0.05$ vs PS1M146L et littermates ; **, $p < 0.01$ vs PS1wt). Il n'y a aucune différence entre les autres groupes.

Figure 7 : Augmentation des niveaux de radicaux libres dans les lymphocytes de souris transgéniques PS1M5. Les niveaux des espèces radicalaires oxygénées (Reactive Oxygen Species) ont été mesurés dans les lymphocytes de souris par
15 cytométrie de flux (Rhodamine123) et exprimés en intensité moyenne de fluorescence (MFI). Les taux de ROS sont significativement plus élevés dans les lymphocytes de souris transgéniques PS1M5 par rapport aux autres groupes (*, $p < 0.05$ vs PS1wt ; **, $p < 0.01$ vs littermates).

Figure 8 : Mobilisation accrue de calcium intracellulaire dans les lymphocytes de souris transgéniques PS1M5. Les niveaux de $[Ca^{2+}]_i$ ont été déterminés en
20 conditions de repos (basal) Les niveaux de calcium intracellulaire sont plus élevés dans les lymphocytes de souris transgéniques PS1M5 que dans les autres groupes. Il n'y a aucune différence entre les autres groupes.

Figure 9 : Réponse calcium intracellulaire accrue après stimulation au PHA dans les
25 lymphocytes de souris transgéniques PS1M5. La différence entre niveaux de $[Ca^{2+}]_i$ après et avant stimulation mitogénique au PHA (15microg/ml) a été représentée. Les

lymphocytes de souris transgéniques PS1M5 répondent plus fortement au stimulus que les autres groupes ($p < 0.01$). Il n'y a aucune différence entre les autres groupes.

- Figure 10 :** Latence de la mobilisation de calcium intracellulaire plus lente dans les lymphocytes de souris transgéniques PS1M5 et PS1M146L. L'intervalle de temps pour atteindre le pic de $[Ca^{2+}]_i$ après stimulation mitogénique au PHA est plus élevé dans les lymphocytes de souris transgéniques PS1M5 (**, $p < 0.05$ vs PS1wt et littermates) ainsi qu'à un moindre degré pour les souris transgéniques PS1M146L (*, $p < 0.05$ vs PS1wt). Il n'y a aucune différence entre souris PS1wt et contrôles non transgéniques (littermates).
- Figure 11 :** Effet des mutations humaines de PS1 dans le cerveau des souris transgéniques sur les mécanismes de protection des radicaux libres. A) Niveaux d'activité de l'enzyme super oxyde dismutase, SOD. B) Niveaux d'activité de l'enzyme glutathion réductase. C) Niveaux de peroxydation lipidique après stimulation au $FeCl_3$. Une baisse significative des mécanismes de détoxification des radicaux libres (SOD et GR) est observée dans le cerveau des souris transgéniques PS1M5 (*, $p < 0.05$ vs PS1wt ; **, $p < 0.05$ vs PS1M146L) avec une tendance à la diminution dans les souris PS1M146L. Réciproquement, les niveaux de peroxydation lipidique stimulée (due à la présence de radicaux libres) est augmentée chez les souris PS1M5.

20

MATERIEL ET METHODES

1. Mutagenèse de Préséniline1-PS1

- L'ADNc de PS1 humain contenant un consensus Kozak au niveau de l'ATG initial, a été précédemment décrit (Pradier et col. 1999). La mutagenèse de PS1 a été effectuée en utilisant le kit de mutagenèse in vitro Sculptor™ (Amersham, France). La région codante de PS1 a été sous-clonée dans le vecteur Bluescript (Stratagène) et un ADN simple brin préparé. Les 5 mutations utilisées dans le cadre de l'invention, ont été

25

introduites à l'aide d'oligonucléotides contenant les mutations souhaitées suivant les instructions du fournisseur :

M146L, 5' GAGGATAGTCG*TGACAACAAT 3'; SEQ ID N°1

H163R, 5' AAGCCAGGCC*TGGATGACCTT 3'; SEQ ID N°2

5 A246E, 5' GATGAGCCAT*GCAGTCCATTG 3'; SEQ ID N°3

L286V, 5' GGAGTAAATGC*GAGCTGGAAA 3'; SEQ ID N°4

C410Y, 5' GGCTACGAAT*CAGGCTATGGT 3', SEQ ID N°5

le * dénote la position de la mutation nucléotidique introduite sur le brin complémentaire. Pour obtenir la construction contenant les cinq mutations combinées (PS1M5 pour multimutant5), cinq mutagenèses successives ont été effectuées. L'ensemble de la séquence de l'ADNc de PS1 a été vérifiée à chaque mutagenèse pour garantir l'absence de mutations non souhaitées.

2. Génération et identification des souris transgéniques

Pour la construction des transgènes, lesADNc de PS1 wild type, PS1M146L et PS1M5 ont été sousclonés dans les sites de restriction SmaI/BamHI du multisite de clonage du vecteur d'expression transgénique HMG (Czech et col. , 1997). Les ADNc sont sous le contrôle du promoteur partiel HMG-CoA reductase qui permet une expression ubiquitaire du transgène. Pour la microinjection, la cassette d'expression a été purifiée par électrophorèse sur gel après restriction avec l'enzyme NotI pour éliminer les séquences non importantes du vecteur. Le transgène purifié a été repris à la concentration finale de 2.5 ng/microl en 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA et injecté dans l'un des deux pronucléi d'ovocytes fécondés de souris. Les embryons survivants sont transplantés dans l'oviducte d'une mère adoptive. La présence du transgène a été analysée par PCR et Southern. La PCR a été effectuée en utilisant des oligonucléotides spécifiques de la séquence de PS1 humain présentant les séquences SEQ ID N°6 5'-TAA TTG GTC CAT AAA AGG C-3' et SEQ ID N°7 5' -

GCA CAG AAA GGG AGT CAC AAG-^{3'} générant un fragment d'amplification de 550 pb. Pour l'analyse de Southern, un fragment PstI-SalI de 1.2 kb, correspondant au premier intron de la cassette d'expression HMG a été marqué au alpha-P³² et utilisé comme sonde pour la détection du transgène et du gène HMG-CoA reductase endogène. Grâce à cette dernière analyse, l'absence de tout réarrangement majeur ou délétion au sein du transgène peut être garantie. Les souris ont été élevées conformément aux règles françaises d'entretien des animaux.

3. Immunoblot

Le tissu cérébral et la rate de souris transgéniques (PS1wt, PS1M146L et PS1M5) et de souris contrôles non transgéniques (littermate) a été homogénéisés sur de la glace dans une solution de sucrose 0.32 M contenant des inhibiteurs de protéase (CompleteTM, Boehringer-Mannheim, Allemagne). Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à 4°C pendant 5 min à 1500g. Les lysats de lymphocytes ont été préparés de la même façon à partir de la fraction de cellules purifiées. La concentration en protéine dans le surnageant a été mesuré à l'aide du test de protéine BCA (Pierce, USA). Pour la détection de PS1, 25 µg d'extrait protéique ont été incubés à 56°C pendant 20 min dans du tampon de dépôt Laemmli contenant de l'urée 8M et du dithiothreitol 50 mM. Les protéines ont été fractionnées par électrophorèse sur gel polyacrylamide (SDS-PAGE). Après transfert des protéines sur filtre de nitrocellulose (Amersham, France), le filtre a été chauffé dans du PBS pendant 5 min afin d'augmenter la sensibilité et immédiatement saturé avec 5% (w/V) de lait écrémé en poudre dans du TBST 50mM Tris-HCl pH 8.1, 150 mM NaCl, 0.05% (V/V) Tween 20 pendant 1h et incubé la nuit à 4°C avec l'anticorps (Ac) primaire anti-PS1 humain, MAB1563 (Chemicon, USA), dilué au 1/10000 en tampon TBST seul. La liaison de l'Ac a été détecté avec un Ac-anti IgG conjugué à la peroxidase de Raifort (Amersham, France) suivi d'un système de détection par chemiluminescence (Amersham, France) selon les instructions du fabricant.

4. Préparation des lymphocytes

Les lymphocytes ont été préparés à partir de rate de souris fraîchement dissociée. La rate est homogénéisée en tampon RPMI puis l'homogénat est passé à travers un filtre 10 microns. L'homogénat cellulaire est lavé plusieurs fois par centrifugation et resuspension. Après lyse des erythrocytes présents, le nombre de cellules est
5 déterminé par comptage au microscope.

Pour obtenir les lymphocytes T, les cellules B ont été contre-sélectionnées par fixation sur des billes magnétiques portant des anticorps anti-cellules B (Dynabeads Mouse pan B, Dynal, Norvège) et séparation des billes. Les cellules restantes sont à plus de 80% des lymphocytes T (CD3 positives) comme déterminé par analyse par
10 cytométrie de flux.

5. Mesure de l'apoptose

Pour déterminer le contenu en ADN en phase G1, qui définit le pourcentage de cellules apoptotiques, après traitements aux différents temps, les lymphocytes T sont séparés par centrifugation et les culots cellulaires repris en tampon de lyse (0.1% citrate de sodium, 0.1% Triton X-100) contenant 50 µg/ml de iodure de propidium
15 (Sigma, Munich). Les échantillons sont conservés à 4°C pour 1-2 heures avant analyse par cytométrie de flux (FACSCalibur, Benckton Dickinson , logiciel Cell Quest). La mort cellulaire a été induite par différents traitements : 2-deoxy-D-ribose (d-Rib, 10mM), peroxide d'hydrogène (H₂O₂, 1 mM) et dexamethasone (dex, 10⁻⁷ M)
20 pendant 2.5h. La mort cellulaire déterminée en absence de traitement a été définie comme apoptose spontanée *in vitro*.

6. Mesure de calcium intracellulaire

La fraction de cellules T est reprise en tampon RPMI et incubée en présence de Fura-2-AM (Molecular Probe, Leiden, Pays-Bas). L'incubation est terminée par ajout de
25 tampon HBSS et lavage de la suspension par centrifugation plusieurs fois pour éliminer le colorant du milieu. La fraction de cellules T est finalement reprise en tampon HBSS et conservée sur glace jusqu'à la mesure de calcium intracellulaire.

La fluorescence Fura-2 a été mesurée comme précédemment décrit (Eckert et al., 1993) en utilisant un spectromètre à luminescence SLM-Aminco avec longueurs d'onde d'excitation à 340nm et 380 nm et d'émission à 510nm. La concentration intracellulaire de calcium $[Ca^{2+}]_i$ a été calculée à partir de la méthode des ratios de Gryniewicz comme décrit précédemment (Eckert et col.1997) en utilisant une valeur de K_d de 224 nM. Comme stimulateur de mobilisation de calcium dans les lymphocytes, la PHA-P (Sigma, Munich) a été rajoutée à la concentration de 15 microgram/ml.

7. Mesure des radicaux libres

La production de radicaux libres (ROS) a été quantifiée par cytométrie de flux (FACSCalibur, Benckton Dickinson) en utilisant comme révélateur fluorescent la dihydrorhodamine 123 (DHR, Molecular Probes). Les cellules sont resuspendues dans 1 ml de tampon HBSS en présence de DHR (concentration finale 10microM) et incubées à 37°C pour 15min en bain agitant. La conversion de DHR en son dérivé fluorescent rhodamine 123 est alors quantifiée et exprimé en intensité moyenne de fluorescence (MFI).

8. Preparation du tissu cérébral.

Les souris ont été utilisées à l'âge de 3-4 mois et sacrifiées par décapitation. Les cerveaux ont été prélevés et lavés extensivement dans du tampon sur glace. Le tissu (cervelet inclus) a été pesé et immédiatement congelé à -20°C. Le tissu a été homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur Potter-Elvehjem dans du tampon Tris-HCl à 5 et 20 mM, respectivement, pour obtenir des homogénéat dilué (poids/volume) au 1/10^e et 1/5^e respectivement.

9. Test d'activité CuZn SOD et glutathion reductase

Les homogénats de cerveau (1/5 p/v) ont été centrifugés à 8.500xg pendant 10minutes à 4°C. Le surnageant a été utilisé pour mesurer les activités SOD et glutathion reductase (GS). L'activité SOD a été mesurée à l'aide d'un kit du type SOD-525

(Calbiochem, Allemagne). Ce kit utilise un réactif spécifique (R1) qui subit une auto-oxidation alcaline qui est accélérée par la superoxide dismutase. Un deuxième réactif (R2) est utilisé pour éliminer les interférences causées par les mercaptans, comme le glutathion. Une unité d'activité SOD-525 est définie comme l'activité doublant le
5 taux d'auto-oxidation de R1. L'activité GR a été similairement dosée à l'aide d'un kit spécifique (Calbiochem, Allemagne) : Ce kit mesure le taux d'oxidation de NADPH en NADP⁺ qui est accompagné d'une diminution d'absorbance à 340 nm qui est détectée par spectrophotométrie. Une unité d'activité GR est définie par la réduction d'une micromole de GSSG à 25°C, pH7.6.

10 **10. Mesure de la peroxidation lipidique (LPO) basale et stimulée dans les tissus cérébraux**

Les homogénats de cerveau (1/10, p/v) sont incubés en tampon contenant (LPO stimulée) ou pas (LPO basale) FeCl₃ et 100 µM pendant 30 min à 37°C dans un bain aqueux agité. Après incubation, les homogénats sont centrifugés à 3000xg pendant
15 10 min. Les surnageants sont utilisés pour détecter la peroxidation lipidique par mesure de la concentration de malondialdéhyde (MDA) à l'aide d'un kit de type LPO-586 (Calbiochem). Ce kit utilise un chromophore spécifique qui réagit avec le MDA à une température modérée (45°C)

20 **EXEMPLES**

Exemple 1 : immunodétection des protéines correspondant aux transgènes PS1wt, PS1M146L et PS1M5

Des souris transgéniques PS1wt, PS1M146L et PS1M5 (multimutant) ont été
25 générées. Le transgène est sous le contrôle du promoteur humain HMG-CoA reductase, un gène de maintenance qui confère une forte expression ubiquitaire

incluant le cerveau (Gautier et al., 1989, Czech et col. 1997 et 1998). Une analyse des niveaux d'expression des transgènes (PS1 humaine) a été effectuée sur les tissus de rate et de cerveau ainsi que sur la fraction de cellules lymphocytaires à l'aide d'un anticorps spécifique de la séquence de PS1 humaine ne reconnaissant pas l'homologue de souris (Fig1). Dans le cerveau (Fig1, pistes 9-12), le fragment N-terminal de PS1 est l'espèce prépondérante avec des niveaux plus élevés pour la PS1M146L comparée à PS1wt. Pour PS1M146L, l'holoprotéine (protéine complète, approx. 50 kDa) est détectable démontrant une saturation du processus d'endoprotéolyse à forte expression de PS1 comme précédemment décrit. Par contre, pour PS1M5, le multimutant, il y a une absence totale d'endoprotéolyse et seule l'holoprotéine est détectable. Des résultats similaires ont été observés dans la rate et les lymphocytes avec des niveaux d'expression variables mais détectables dans tous ces tissus.

Exemple 2 : Apoptose spontanée accrue dans les lymphocytes isolés de souris transgéniques PS1 multi-mutées.

Cet exemple a pour but de démontrer que les cellules périphériques du modèle animal exprimant la PS1 multi-mutée présentent une apoptose spontanée accrue et persistante dans le temps.

- Les lymphocytes isolés de souris transgéniques exprimant PS1wild type (sans mutation) ont le même niveau d'apoptose basale (2.8%) que les contrôles non-transgéniques issus de la même portée (littermate) (Fig2). Par contre, cette apoptose spontanée est fortement augmentée (6%) chez les souris transgéniques exprimant la mutation PS1-M146L ou la multimutation PS1M5.
- De manière très intéressante, après culture pendant 2.5 h sans stimulus apoptotique, les niveaux d'apoptose spontanée pour les lymphocytes de PS1M5 sont plus élevés

que pour PS1wt ou le simple mutant PS1M146L ou encore les controles non-transgéniques (Fig3).

Ces résultats démontrent que les cellules de l'animal transgénique de l'invention et en particulier celles des tissus périphériques (lymphocytes notamment) présentent non seulement une apoptose spontanée plus élevée par rapport aux contrôles mais également qu'elle persiste dans le temps.

Exemple 3 : Augmentation de l'apoptose induite par traitement au déoxyribose dans les lymphocytes issus de souris transgéniques PS1M5.

Cet exemple a pour but de démontrer que l'apoptose induite par le déoxyribose est beaucoup plus forte dans le modèle de souris PS1 multi-mutant.

Après induction par traitement au 2-deoxy-D-ribose (d-Rib), les niveaux d'apoptose sont significativement plus élevés pour les lymphocytes transgéniques PS1M5 que pour PS1wt , simple mutant PS1-M146L ou les controles non-transgéniques (Fig4).

Cette augmentation de l'apoptose après induction démontre une réponse accrue (sensibilisation) à un stress apoptotique due à l'expression de PS1 multimutante. Combiner avec une augmentation d'apoptose basale, ces résultats indiquent clairement que l'expression transgénique d'une forme multimutée de PS1 entraîne une bien plus grande sensibilité à l'apoptose dans les lymphocytes.....

20

Exemple 4 : Augmentation de l'apoptose induite par traitement au peroxyde d'hydrogène dans les lymphocytes issus de souris transgéniques PS1M5.

Cet exemple a pour but de démontrer que l'apoptose induite par le peroxyde d'hydrogène est beaucoup plus forte dans le modèle de souris PS1 multi-mutant.

Après stimulation par traitement au peroxide d'hydrogène (H₂O₂), les niveaux d'apoptose sont significativement plus élevés dans les lymphocytes PS1M5 que pour les autres transgéniques ou non-transgéniques ($p < 0.001$, Fig5). Il n'y a pas de différence significative entre les lymphocytes transgéniques PS1wt (S182) et simple mutant PS1M146L ou les controles non transgéniques.

Cette augmentation de l'apoptose après induction par un stress différent démontre la généralité de l'hypersensibilité à l'apoptose observée dans ce modèle.

Exemple 5 : Augmentation de l'apoptose induite par traitement à la dexaméthasone dans les lymphocytes issus de souris transgéniques PS1M5.

Cet exemple a pour but de démontrer que l'apoptose induite par un traitement à la dexaméthasone est beaucoup plus forte dans le modèle de souris PS1 multi-mutant.

De même, après stimulation par la dexaméthasone, les niveaux d'apoptose sont significativement plus élevés dans les lymphocytes PS1M5 que pour les autres transgéniques ou non-transgéniques ($p < 0.01$, Fig6). Il n'y a pas de différence significative entre les lymphocytes transgéniques PS1wt et simple mutant PS1M146L ou les controles non transgéniques.

Cette augmentation de l'apoptose après induction par un troisième stress différent confirme la généralité de l'hypersensibilité à l'apoptose conférée par l'expression transgénique de PS1 multimutée (mais pas simple mutant).

Exemple 6 : Augmentation des niveaux de radicaux libres dans les lymphocytes de souris transgéniques PS1M5.

Les niveaux de agents radicalaires oxygénés (Reactive Oxygen Species) ont été mesurés dans les lymphocytes de souris par cytométrie de flux . Les taux de ROS sont

significativement plus élevés dans les lymphocytes de souris transgéniques PS1M5 ($p < 0.05$) par rapport aux autres groupes (Fig7). Il n'y a pas de différence significative entre les autres groupes bien qu'une tendance à l'augmentation des niveaux de ROS se dessine entre les contrôles littermates et les transgéniques PS1wt et PS1M146L.

- 5 Cette augmentation des niveaux de ROS démontre qu'on peut détecter en conditions basales dans ce modèle une altération d'un paramètre biochimique (fortement affecté dans l'AD) qui pourrait soutenir l'hypersensibilité à l'apoptose.

Exemple 7 : Mobilisation accrue de calcium intracellulaire dans les lymphocytes de souris transgéniques PS1M5 .

- 10 Parce que l'apoptose est modulée par les niveaux intracellulaires de calcium, ces derniers ont été analysés dans les lymphocytes des souris transgéniques. Au repos, les niveaux de $[Ca^{2+}]_i$ pour les contrôles et les souris transgéniques PS1wt et PS1M146L sont identiques (inférieurs ou égaux à environ 150 nM). Le multiple mutant PS1M5 démontre une légère élévation des taux de base (supérieur à 200 nM) (Fig 8).
- 15 Après stimulation mitogénique (PHA, 15 microg/ml), les niveaux de calcium intracellulaire augmentent d'approximativement 70nM dans les souris contrôles et transgéniques PS1 wt et PS1M146L (Fig 9). Par contre, pour les souris PS1M5, cette augmentation est de 190 nM ce qui est statistiquement différent des autres groupes ($p < 0.01$). Donc, non seulement les niveaux de $[Ca^{2+}]_i$ sont plus élevés en conditions
- 20 basales, mais la réponse nette à un stimulus est elle-aussi plus importante résultant en des niveaux absolus beaucoup plus élevés (400 nM par rapport à 200-220 nM pour les autres groupes, différence statistiquement significative).

- De plus par rapport aux contrôles non transgéniques qui exhibent une réponse calcique très rapide, la latence pour atteindre le pic de $[Ca^{2+}]_i$ après stimulation au
- 25 PHA est fortement augmentée dans les lymphocytes des transgéniques PS1M5 et à un moindre degré pour les PS1M146L (Fig10) mais pas dans les PS1wt.

Les différences des niveaux et cinétiques des réponses calciques dans les lymphocytes démontrent une forte altération des processus de mobilisation des réserves intracellulaires de calcium due à l'expression de PS1 multimutant dans ce modèle. L'altération de la cinétique des réponses calciques avait été démontrée précédemment dans les lymphocytes des patients AD ce qui renforce la pertinence de ce modèle animal.

Exemple 8 : Etude du métabolisme des radicaux libres dans le cerveau.

Pour confirmer la pertinence par rapport à la maladie d'Alzheimer des déficits observés chez les souris transgéniques de l'invention, il a été recherché si des altérations pathologiques étaient identifiables au niveau du cerveau de ces animaux. En particulier les mécanismes de protection contre les radicaux libres ont été analysés puisque ces derniers sont impliqués dans les phénomènes d'apoptose liés aux présénilines et qu'une altération dans les lymphocytes de souris transgéniques PS1M5 a été démontrée dans l'exemple 6.

Les analyses ont été effectuées sur des animaux de 3-4 mois d'âge. Par rapport aux souris transgéniques PS1wt, les PS1M146L démontrent une baisse des niveaux d'activité SOD d'approximativement 20% dans le cerveau (Fig11A). Cette diminution est encore accentuée chez les transgéniques PS1M5 (-28%, $p < 0.05$).

L'activité glutathion réductase est elle aussi significativement diminuée dans le cerveau des transgéniques PS1M5 (-27%, $p < 0.05$). A l'inverse, on note une diminution vraiment modeste de cette activité effet modeste chez les transgéniques PS1-M146L (Fig11B).

Les niveaux de peroxydation lipidique en basal étaient identiques dans tous les groupes de souris. Après stimulation au FeCl_3 , par contre, les niveaux de peroxydation lipidique sont accrus dans les transgéniques PS1M5 (+ 20%, Fig 11C).

Chez des jeunes adultes (3-4 mois) transgéniques PS1M5 multimutée, on observe donc un déficit des mécanismes de protection des radicaux libres et parallèlement une augmentation de la sensibilité à la peroxydation lipidique dans le cerveau. Cet effet corréle parfaitement avec la sensibilité accrue à l'apoptose, les altérations de mobilisation de calcium intracellulaire et l'augmentation des taux d'espèces radicalaires oxygénées observées dans les lymphocytes de ces transgéniques qui expriment artificiellement le transgène dans ces deux tissus. Le déficit des mécanismes de protection contre les radicaux libres a aussi été relevé chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, confirmant ainsi la pertinence de ce modèle animal.

Références :

- Chui, D-H, Tanahashi, H., Ozawa, K., Ikeda, S., Checler, F., Ueda, O., Suzuki, H., Araki, W., Inoue, H., Shirotani, K., Takahashi, K., Gallyas, F. and Tabira, T. (1999) Transgenic mice with Alzheimer presenilin1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nature Medecine* 5 :560-564.
- Czech, C., Delaere, P., Macq, A.-F., Reibaud, M., Dreisler, S., Touchet, N., Schomber, B., Mazadier, M., Mercken, L., Theisen, M., Pradier, L., Octave, J.-N., Beyreuther, K. and Tremp, G. L. (1997) Proteolytical processing of mutated human amyloid protein precursor in transgenic mice. *Mol. Brain Res.* 47, 108-116.
- Czech, C., Lesort, M., Tremp, G., Terro, F., Blanchard, V., Schombert, B., Carpentier, N., Dreisler, S., Bonici, B., Takashima, A., Moussaoui, S., Hugon, J. and Pradier, L. (1998) Characterization of human presenilin 1 transgenic rats: increased sensitivity to apoptosis in primary neuronal cultures. *Neuroscience* 87, 325-36.

Eckert, A., Förstl H., Zerfass, R., Hennerici, M. and Müller, WE. (1997) Free intracellular calcium in peripheral cells in Alzheimer's Disease. *Neurobiol. Aging* **18** : 281-284.

- 5 Eckert, A., Förstl H., Zerfass, R., Oster, M., Hennerici, M. and Müller, WE. (1998) Changes in intracellular calcium regulation in Alzheimer's Disease and vascular dementia. *J. Neural Transm. (Suppl.)* **53** :259-267

- 10 Gautier, C., Methali, M. and Lathe, R. (1989) A ubiquitous mammalian expression vektor, pHMG, based on a housekeeping gene promoter. *Nucleic. Acids. Res.* **17**, 8398

- 15 Luthi, A., Putten, H., Botteri, F. M., Mansuy, I. M., Meins, M., Frey, U., Sansig, G., Portet, C., Schmutz, M., Schroder, M., Nitsch, C., Laurent, J. P. and Monard, D. (1997) Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* **17**, 4688-99.

- 20 Pradier, L., Carpentier, N., Delalonde, L., Clavel, N., Bock, M.-D., Buée1, L., Mercken, L., Tocqué, B. and Czech, C. (1999) Mapping the APP/presenilin (PS) binding domains: the hydrophilic N-terminus of PS2 is sufficient for interaction with APP and can displace APP/PS1 interaction. *Neurobiol. Dis.* **6**, 43-55.

Price DL and Sisodia SS (1998). Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu. Rev. Neurosci.* **21** :479-505.

- 25 Sasahara, M., Fries, J. W., Raines, E. W., Gown, A. M., Westrum, L. E., Frosch, M. P., Bonthron, D. T., Ross, R. and Collins, T. (1991) PDGF B-chain in neurons of the central nervous system, posterior pituitary, and in a transgenic model. *Cell* **64**, 217-27.

Scott, M. R., Kohler, R., Foster, D. and Prusiner, S. B. (1992) Chimeric prion protein expression in cultured cells and transgenic mice. *Protein Sci* 1, 986-97.

- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M.,
5 Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K. et al. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-60.

Yankner BA (1996). Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron*.16 :921-932.

REVENDICATIONS

1. Animal transgénique exprimant une forme multi-mutée de la préséniline 1 et permettant de détecter un phénomène apoptotique dans un tissu périphérique renouvelable.
5
2. Animal transgénique selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il permet de détecter un phénomène apoptotique dans ses lymphocytes.
3. Animal transgénique selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il permet de détecter un phénomène apoptotique dans ses lymphocytes T
- 10 4. Animal transgénique selon la revendication 1, caractérisé en ce que les mutations dans le gène de la PS1 sont les mutations M146L, H163R, A246E, L286V, C410Y, , I143T, L235P, P264L, P267S, E317G, G384A, L392V, A426P et /ou P436S.
5. Animal selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'il s'agit des mutations M146L, H163R, A246E, L286V, C410Y, combinées entre elles.
- 15 6. Utilisation du modèle animal tel que décrit selon les revendications 1 à 5 pour la mise en évidence de composés destinés au traitement des maladies neurodégénératives, de préférence la maladie d'Alzheimer.
7. Cellule extraite d'un modèle animal tel que décrit selon les revendications 1 à 5.
8. Utilisation d'une cellule telle que décrite selon la revendication 7, pour la mise en
20 évidence de composés destinés au traitement des maladies neurodégénératives, de préférence la maladie d'Alzheimer.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1/11

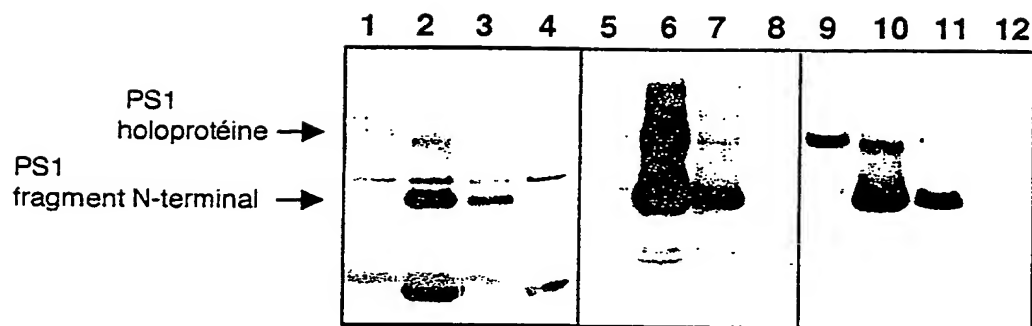


Figure 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/11

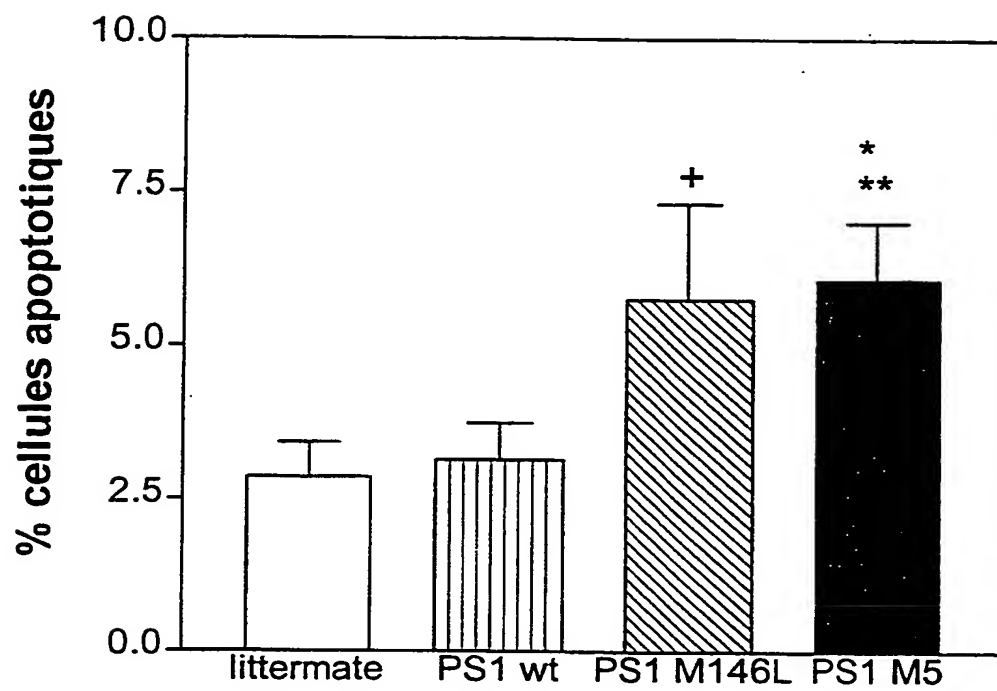


Figure 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/11

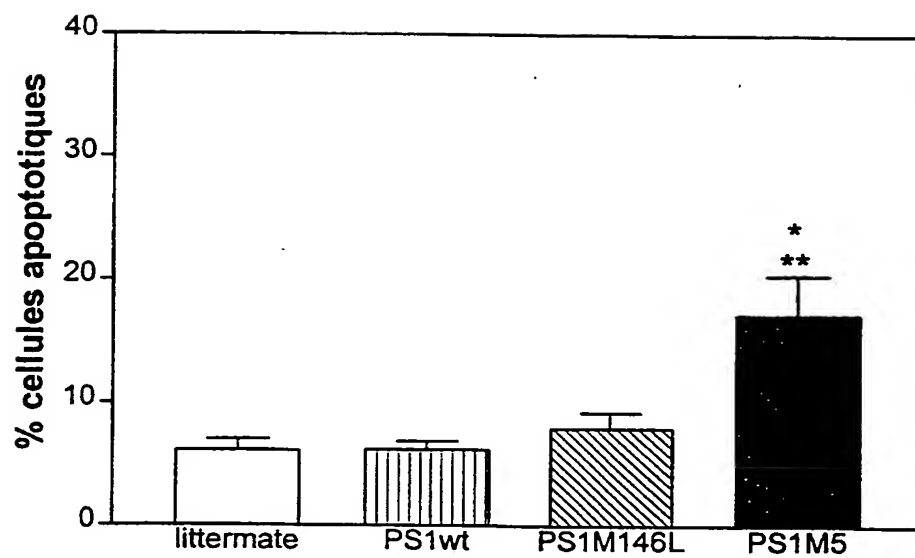


Figure 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/11

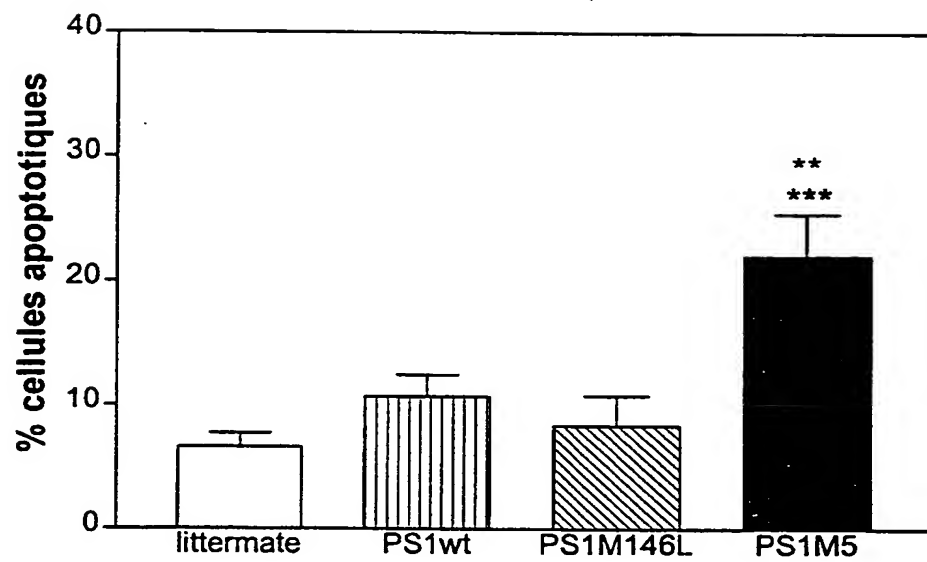


Figure 4

1

•

•

THIS PAGE BLANK (USPTO)

•

•

•

•

5/11

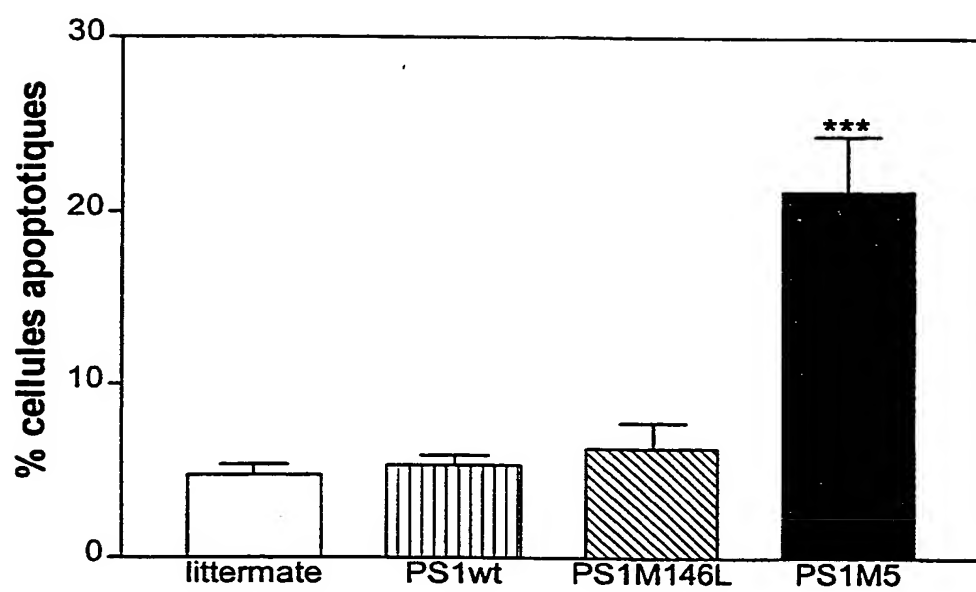


Figure 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/11

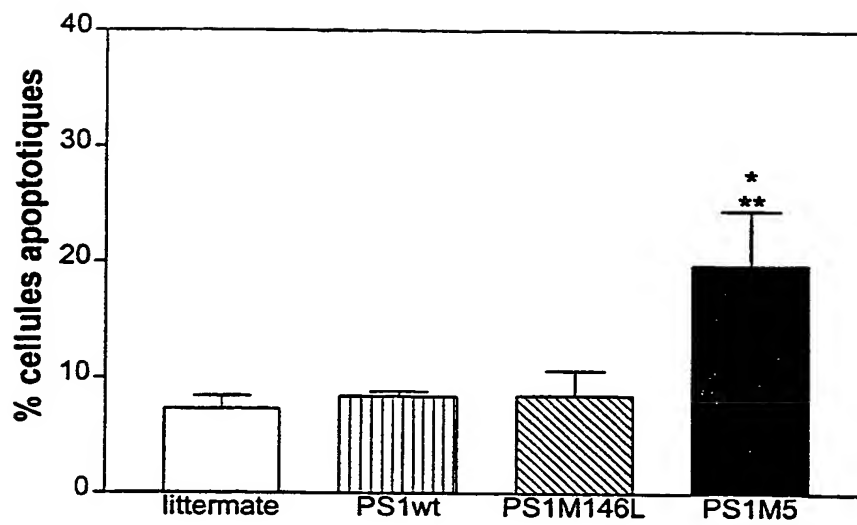


Figure 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7/11

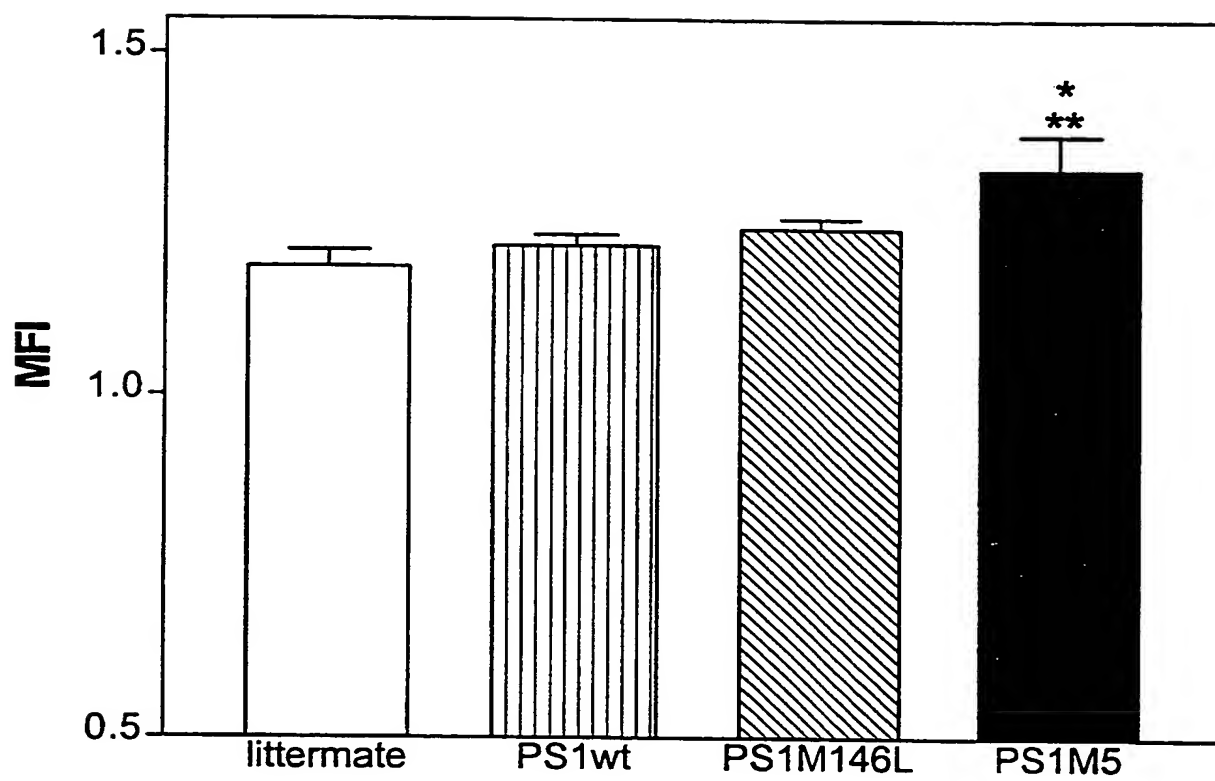


Figure 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/11

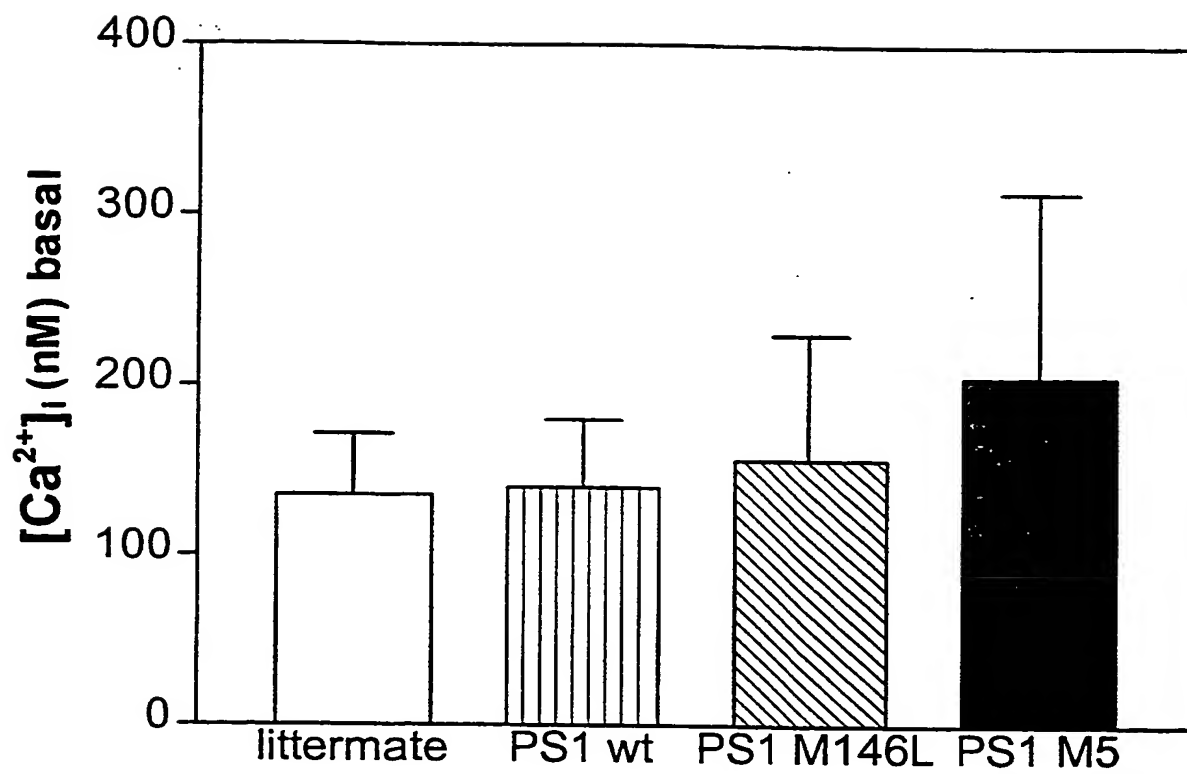


Figure 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9/11

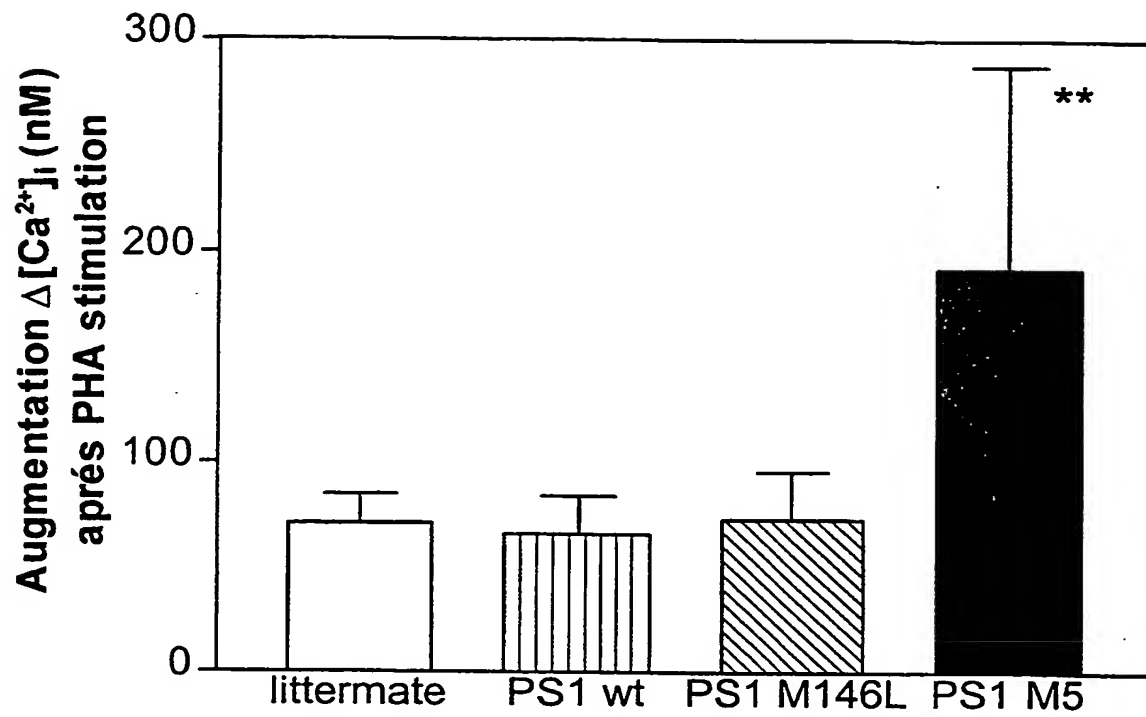


Figure 9

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/11

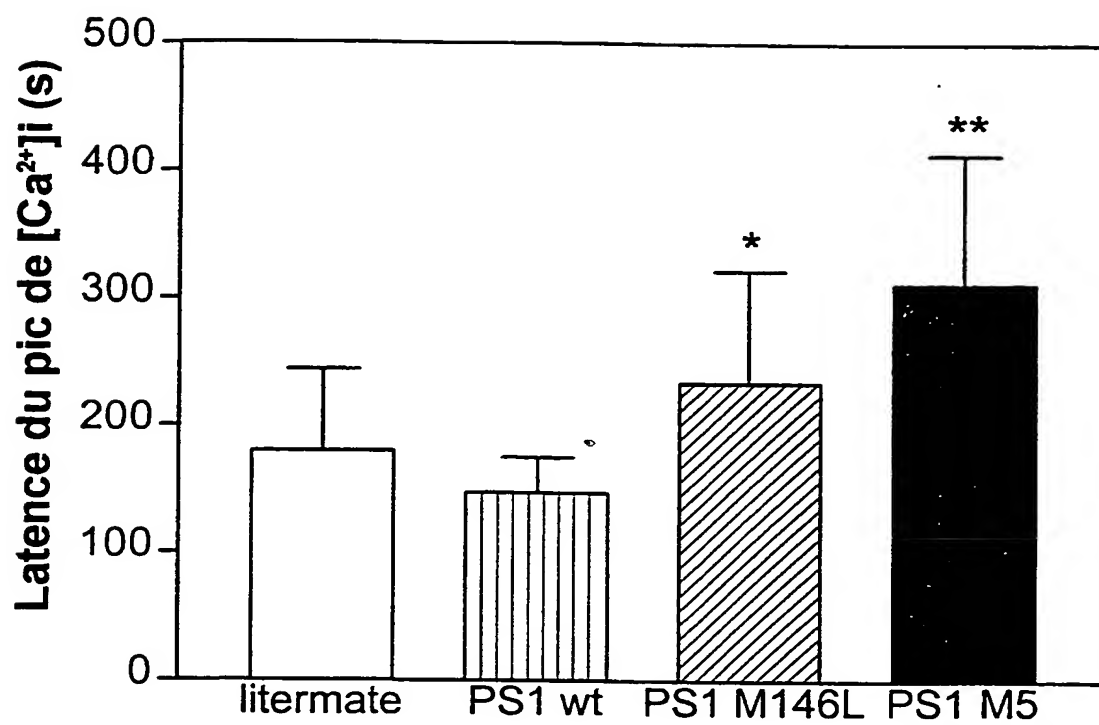


Figure 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11/11

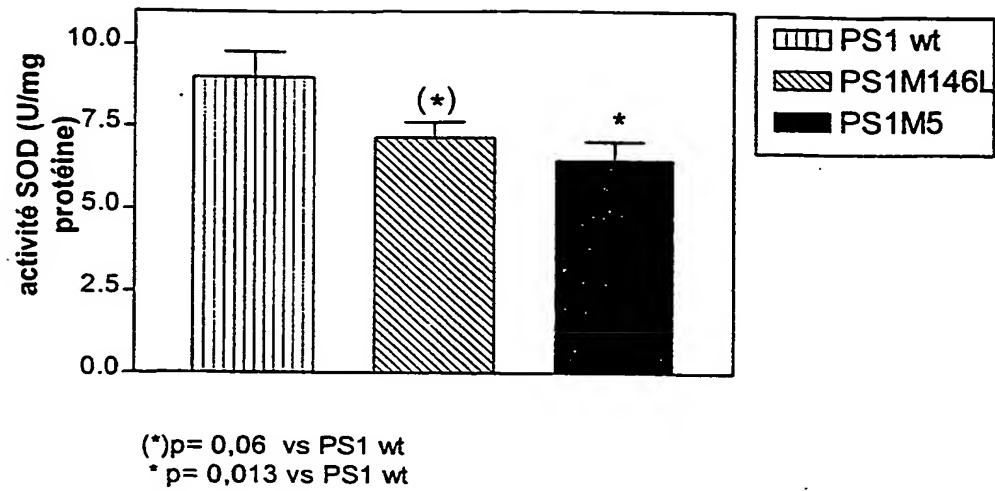


Figure 11A

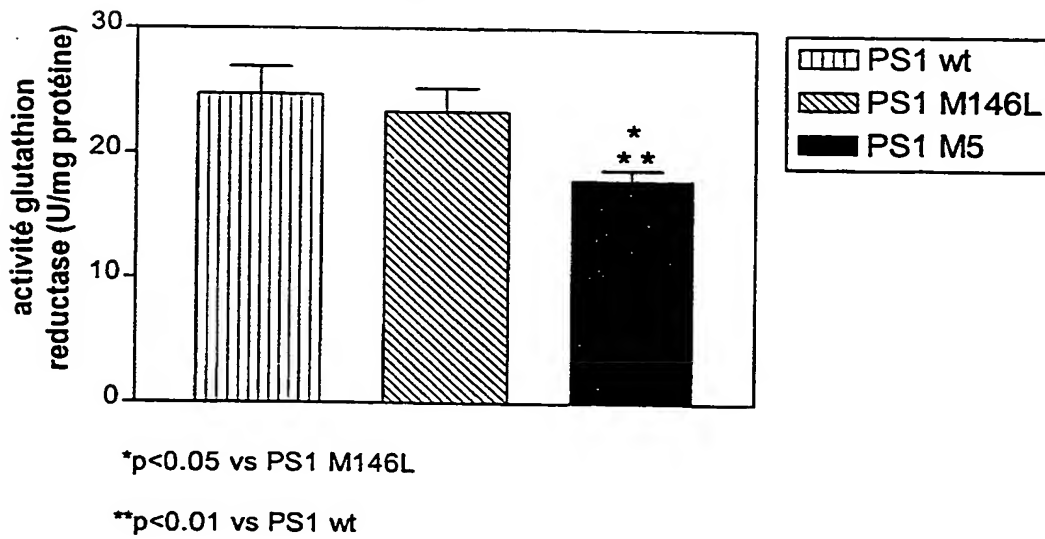


Figure 11B

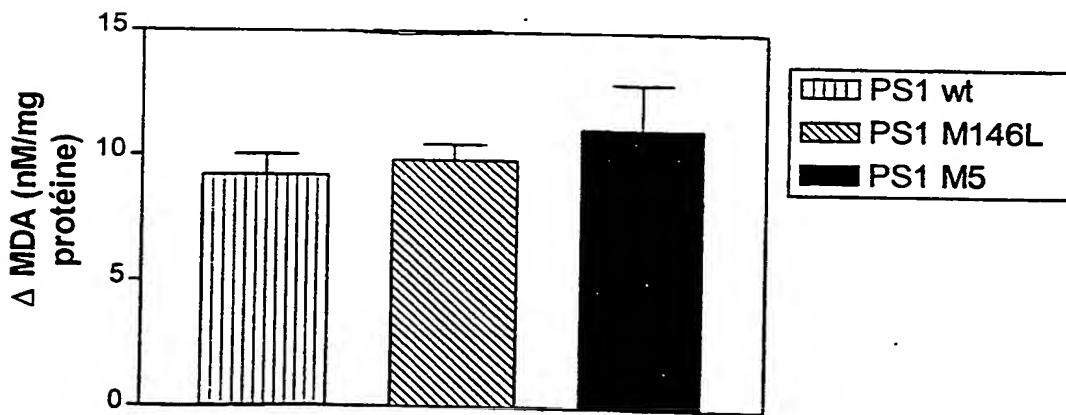


Figure 11C

THIS PAGE BLANK (USPTO)